

京都大学	博士（ 医 学 ）	氏 名	五味 正憲
論文題目	Single and local blockade of IL-6 signaling promotes neuronal differentiation from transplanted embryonic stem cell-derived neural precursor cells (移植時の単回、局所の IL6 シグナル阻害によって ES 細胞由来神経幹細胞の神経分化が促進される)		
(論文内容の要旨)			
Embryonic stem (ES)細胞はその自己複製能と多分化能より細胞移植治療に適した細胞種の一つと考えられている。しかし、実際の臨床応用には様々な問題があり、その一つが移植細胞に対する免疫炎症反応である。 前研究により、一般的に用いられている免疫抑制剤 Cyclosporine A (CsA)の効果は ES 細胞由来神経幹細胞の脳内へ移植の際に、生着には影響を与えないが移植細胞の分化に関与することが明らかになった。この結果を受けて本研究では、移植時に発現するサイトカインに注目し、より効果的な免疫修飾の方法について検討した。 はじめに移植によって誘導されるサイトカインについて検討した。マウス ES 細胞を Stromal cell-derived inducing activity (SDIA)法にて神経幹細胞へ誘導しマウスの線条体に移植を行い、移植片とその周囲脳組織でのサイトカイン mRNA の発現を調べた。結果、移植後 24 時間から 72 時間の間に IL1-b, IL-4,IL-6,IFNγ,TNFα の発現上昇がみられた。次にこれらのサイトカインの神経幹細胞の分化に与える影響を in vitro で検討した。SDIA 法で誘導した神経幹細胞に、移植によって発現誘導されることが明らかになった上記 5 種のサイトカインを添加したところ IL-6 のみがグリア細胞への分化を促進することが明らかになった。ここで、IL-6 のシグナルを阻害する anti-IL-6 receptor antibody (MR16-1)を用いると濃度依存的に IL-6 の作用に拮抗することがわかった。 また、IL-6 の受容体である CD126 の発現について検討したところ ES 細胞では発現は低いが神経幹細胞に分化するに従って発現が上昇してくることを、RT-PCR,免疫染色で確認した。 これらの結果により、移植時に分泌される IL-6 の効果を阻害すれば、cyclosporine A の投与と同様に神経幹細胞の神経分化誘導が得られると考えた。また、投与方法としては移植片に MR16-1 を加えることにより、免疫炎症反応が起きている場所に抗体が高濃度に集積することとなり、効率的に IL-6 のシグナルを阻害すると考え、移植片と同時投与することとした。 移植 2 週と 8 週で検討したところ MR16-1 同時投与により移植片の神経分化が促進されていることがわかった。この効果は cyclosporine A の持続投与と効果が同程度であった。この効果は、移植片周囲脳組織での STAT3 のリン酸化を評価したところ、MR16-1 同時投与によりリン酸化が抑制されていたことから、MR16-1 の投与により IL-6-STAT3 のシグナル経路が抑制されたことによると考えられた。 また、炎症反応の評価として浸潤炎症細胞 (CD45)、好中球 (myeloperoxidase)、活性化マクロファージ (Iba1)、T 細胞 (CD3)について免疫			

組織学的に検討したところ、MR16-1 同時投与により移植片に集まる免疫細胞の集簇も抑制されることが明らかになった。さらに移植片からの軸索の進展や移植細胞の遊走を阻害する gliosis の検討を行ったところ、8 週の時点で移植片周囲の gliosis も MR16-1 同時投与で抑制することがわかった。 以上により、神経幹細胞の脳内への移植の際に anti-IL-6 receptor antibody を同時移植することにより、移植細胞の神経分化が促進され、効果的な免疫修飾も得ることができ、さらには移植片周囲の gliosis の抑制も確認することができ、移植治療に有効であると考える。 (論文審査の結果の要旨) Embryonic stem (ES)細胞による細胞移植治療には様々な問題があり、その一つが移植細胞に対する免疫炎症反応である。本研究では、移植時に発現するサイトカインに注目し、効果的な免疫修飾の方法について検討した。 はじめにマウス ES 細胞由来神経幹細胞をマウスの線条体に移植を行い、周囲組織での発現上昇がみられたサイトカインのうち、IL-6 のみがグリア細胞への分化を促進することが明らかになった。ここで、IL-6 のシグナルを阻害する IL-6 受容体抗体 (MR16-1)を用いると IL-6 の作用に拮抗することがわかった。 これらの結果により、移植片に MR16-1 を加えることにより、効率的に IL-6 のシグナルを阻害すると考え、移植片と同時投与することとした。すると MR16-1 同時投与により cyclosporine A の持続投与と同程度に移植片の神経分化が促進され、さらに移植片に集まる免疫細胞の集簇も抑制されることが明らかになった。また移植片からの軸索の進展や移植細胞の遊走を阻害する gliosis も MR16-1 同時投与で抑制することがわかった。 以上により、神経幹細胞の脳内への移植の際に IL-6 受容体抗体で処理した後、移植することにより、移植細胞の神経分化が促進され、効果的な免疫修飾も得ることができ、さらには移植片周囲の gliosis の抑制も確認することができ、移植治療に有効であると考えた。 以上の研究は脳内への幹細胞由来神経幹細胞移植の免疫機構についての解明に貢献し、今後の中枢神経系への幹細胞移植治療の発展に寄与するところが多い。したがって、本論文は博士（医学）の学位論文として価値のあるものと認める。 なお、本学位授与申請者は、平成23年5月24日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。			
要旨公開可能日： 年 月 日以降			